MESSUNG DER LACTATDEHYDROGENASE-AKTIVITÄT EINZELNER FIBROBLASTEN IN DER MITOSE

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

HANS PETER BERNHARD
Maienfeld und Chur (GR)

Basel, 1970

MESSUNG DER LACTATDEHYDROGENASE-AKTIVITÄT
EINZELNER FIBROBLASTEN IN DER MITOSE

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

HANS PETER BERNHARD
Maienfeld und Chur (GR)

Basel, 1970

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Professoren Dr. Matthys Staehelin und Dr. Adolf Portmann.

Basel, den 30. Juni 1970

Prof. Dr. S. Fallab
Dekan

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL und METHODEN	
Zellmaterial	4
Kulturmethode	4
Bestimmung der Zellzahl	5
Bestimmung der LDH-Aktivität	6
Eichlösungen	11
Isolation von Einzelzellen	12
Inkubationsschritt: Lactatoxydation	13
ERGEBNISSE	
Prüfung der Methode	14
Erfassungsbereich der Methode	16
Michaeliskonstanten	16
Wachstumscharakteristik	16
LDH-Aktivität in Abhängigkeit vom Kulturwachstum	18
LDH-Aktivität in Abhängigkeit vom Zellzyklus	19
LDH-Aktivität verschiedener Zellpopulationen	20
LDH-Aktivität verschiedener Zellinseln "Klone"	22
DISKUSSION	25
ZUSAMMENFASSUNG	29
LITERATURVERZEICHNIS	31
TABELLENANHANG	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546022_0092

EINLEITUNG

Die Lactatdehydrogenase LDH EC 1.1.1.27 wurde in Kulturen von Säugetierzellen schon verschiedentlich nachgewiesen (1,2,3,4,5,6,7). Der Hauptanteil des Enzyms befindet sich in der löslichen Phase des Zytoplasmas (8). Ribosomale LDH von Leber- und Nierenzellen des Meerschweinchens wurde von KECK und CHOULES (9) beschrieben. Die Autoren kamen zum Schluss, dass es sich dabei vorwiegend um an Ribosomen adsorbiertes Enzymprotein handelt. Schliesslich wurde LDH auch in isolierten Zellkernen verschiedener Gewebe nachgewiesen (10). VESELL und BEARN (11) zeigten, dass es sich bei dem nucleären und zytoplasmatischen Enzym um verschiedene Isoenzyme der LDH handelt.

Die Bedeutung der LDH für den Stoffwechsel in vitro gezüchteter Säugetierzellen ist noch unklar. Wahrscheinlich ist das Enzym am Glucosestoffwechsel massgeblich beteiligt. Dieser verläuft auch bei Säugetierzellen in Kultur über den Embden-Meyerhof- und Krebszyklus. Die Zellen zeigen häufig eine Tendenz Milchsäure im Kulturmedium anzuhäufen. Die Annahme, dass dies eine spezifische Eigenschaft maligner Zellen in vitro sei, scheint sich nicht zu bestätigen. Die Bildung von Milchsäure unter aeroben Bedingungen ist typisch für normale,

embryonale Zellen und wurde auch in verschiedenen normalen, adulten Zellen gefunden (12). Die meisten Zellkulturen zeigen zusätzlich einen ausgeprägten Pasteureffekt. Unter anaeroben Kulturbedingungen wird Glucose fast vollständig zu Milchsäure abgebaut. Die Aktivität der LDH ist gleichzeitig stark erhöht (13). Unter aeroben Bedingungen schwankt der Glucosanteil, der zu Milchsäure abgebaut wird, zwischen 5 - 70% je nach Zelltyp und Kulturbedingungen (12). Andere Funktionen der LDH, die nicht mit dem Coenzym NADH zusammenhängen, könnten im Zellstoffwechsel ebenfalls von Bedeutung sein (14). ERNSTER (15) hat darauf hingewiesen, dass die LDH bei der Reoxydation von NADPH in der Leber eine entscheidende Rolle spielen dürfte.

DELUCA (2) und KLEVECZ (4,5) haben die LDH-Aktivität von Massenzellkulturen in Abhängigkeit des Kulturwachstums gemessen und charakteristische Schwankungen der LDH-Aktivität beschrieben. Von RUDDLE (6) wurde mit histochemischen Methoden die LDH-Aktivität an einzelnen Zellen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit haben wir versucht, die LDH-Aktivität einzelner Zellen mit biochemischen Methoden quantitativ zu erfassen. Die Beantwortung folgender Fragen sollte damit ermöglicht werden:

- Welche Faktoren beeinflussen die LDH-Aktivität kultivierter Einzelzellen?
- Wie verhalten sich die LDH-Aktivitätswerte von Zellen in der Mitosephase gegenüber den Werten von Zellen in der Interphase?
- Wie gross sind die LDH-Aktivitätsunterschiede von Einzelzellen innerhalb einer Population?
- Können innerhalb einer Zellpopulation Klone oder Areale mit signifikant verschiedenen LDH-Aktivitäts-Mittelwerten gefunden werden?

Die Beantwortung der beiden letzten Fragen zeigt, ob Einzelzellmessungen für das Studium der Enzymaktivitäten von Zellkulturen repräsentative Resultate ergeben. Für die Untersuchung intrazellulärer Enzymregulation ist es aufschlussreich morphologische und biochemische Daten der einzelnen Zelle zu vergleichen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Laboratorium für Gewebekultur des Anatomischen Instituts der Universität Basel (Vorsteher Prof. G. Wolf-Heidegger) begonnen und teilweise an der Abteilung für experimentelle Medizin der Firma Hoffmann-La Roche Basel ausgeführt. Herrn Prof. G. Wolf-Heidegger und Herrn Dr. H.R. Staiger, Hoffmann-La Roche, möchte ich für das mir gewährte Gastrecht meinen herzlichen Dank aussprechen. Herrn Prof. Matthys Staehelin danke ich für seine wertvolle fachliche Beratung. Mein besonderer Dank gilt meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. A. Portmann, der durch sein stetes Wohlwollen diese Arbeit im Rahmen des Fachgebietes Zoologie ermöglichte.

M A T E R I A L und M E T H O D E N

Zellmaterial

Für die Ausführung unserer Experimente verwendeten wir eine aneuploide, etablierte Zellinie BCHL*. Diese Zellinie ist abgeleitet von einem Lungenexplantat eines chinesischen Hamsters (Cricetulus griseus).
Die Zellinie wurde nach 32 Passagen mit einem Zusatz von 10% Dimethylsulfoxyd tiefgefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Unsere Experimente wurden mit Kulturen der Passagen 43-60 ausgeführt.

Kulturmethoden

Die Zellen wurden teils in Glasflaschen, teils in Polystyren-Petrischalen** gezüchtet. Als Kulturmedium verwendeten wir F 10 mit einem Zusatz von 10% foetalem Kälberserum (16). Die LDH des Kälberserums wurde durch Erhitzen auf 56°C während 60 Min. zerstört.

---

* Die Zellinie BCHL wurde uns freundlicherweise von Dr. H.R. Staiger, Abt. experimentelle Medizin der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt. Die Zellinie BCHL war aneuploid in der 33. Passage. Sie setzte sich zusammen aus Populationen mit Karyotypen x = 23/24/26 (17).

** Falcon plastics 6-cm Petri dishes

Dem Kulturmedium wurden zusätzlich 20mg/l Streptomycin und 20'000 E/l Penicillin hinzugefügt.
Die Ablösung der Zellen für Passagen und Zellzahlbestimmungen erfolgte mit Trypsinlösung 0.1% in phosphatgepufferter Salzlösung nach Dulbecco, pH 7.2. Für den Ansatz von Stammkulturen wurden 10^7 Zellen pro 20ml Kulturmedium in Glasflaschen zu je 250ml angesetzt. Die Stammkulturen wurden in Intervallen von 48 Stunden passagiert.

Bei Enzymbestimmungen wurde darauf geachtet, dass die Stammkulturen für experimentelle Ansätze mindestens zwei Wochen in Kultur geführt worden waren. Nach dieser Zeit haben sich die Zellen an das Kulturmedium adaptiert und weisen eine maximale spezifische Enzymaktivität auf (6). Die Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase trypsinisiert (vergl. Wachstumscharakteristik S. 16). Pro Petrischale wurden 50'000 Zellen in 5ml Kulturmedium angesetzt und bei 37°C unter kontinuierlicher Begasung mit einem Gemisch von 5% CO_2 und Luft kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden mit 2-5ml Trypsinlösung in den Petrischalen abgelöst und bei 230g während 10 Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde je nach Populationsdichte der verwendeten Kultur in 100 - 1000 µl Hanks-Pufferlösung pH 7.4 resuspendiert. Für die Bestimmung der

Zellzahl wurden Zellsuspensionen in einer Leukozyten-Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Die Zellzahl und Enzymaktivitätswerte wurden aus identischen Kulturen ermittelt.

Bestimmung der Lactatdehydrogenase Aktivität

Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgte in zwei Schritten:

1.) Enzymatische Oxydation von L(+)Lactat zu Pyruvat
L(+)Lactat + NAD $\rightleftharpoons$ Pyruvat + NADH
Anschliessend vollständige Zerstörung des NAD mit einem Ueberschuss NaOH.

2.) Bestimmung des reduzierten Nicotinamid-adenin-dinucleotids NADH mittels "enzymatic cycling" nach LOWRY (18). NADH katalysiert die enzymatische Dismutation zwischen den beiden Substraten α-Ketoglutarat und L(+)Lactat. Nach mehreren tausend Zyklen wird das akkumulierte Reaktionsprodukt Pyruvat in einem weiteren Schritt enzymatisch mit kristallisierter LDH reduziert und quantitativ bestimmt (Fig. 1).

Für uns stellte sich die Aufgabe, die beiden Reaktionen zu verbinden. Die Lactatoxydation und die Pyruvatreduktion wurden auf ihre Eignung für die Kopplung mit der

Pyridinnucleotid-Bestimmung geprüft und in Vorversuchen im Makromasstab durchgeführt. Damit sollten die optimalen Reaktionsbedingungen für die in den Fibroblasten vorliegende LDH festgelegt werden. Eine umfassende Charakterisierung des Enzyms wurde nicht angestrebt.

Für die LDH-Aktivitätsbestimmungen an Massenzellkulturen wurden verschiedene Extraktionsverfahren geprüft, um eine vollständige und schonende Extraktion des Enzyms zu erreichen (Tab. 1).
Bei der Verwendung von Trypsin für die Ablösung der Zellen wurden gegenüber den anderen Verfahren signifikant erniedrigte LDH-Aktivitätswerte gefunden (Tab. 1). Diese Erfahrung wurde auch von KLEVECZ (5) gemacht. Auf welche Art das Trypsin die Enzymaktivität herabsetzt, ist unklar. Möglicherweise wird die Aktivität des Enzymmoleküls durch Trypsin erniedrigt. Es ist sicher, dass durch Trypsin die Zellmembranen angegriffen werden. Das lösliche Enzym könnte dabei teilweise aus den Zellen an den Ueberstand abgegeben werden. Die überstehende Trypsinlösung wurde bei dem von uns angewandten Verfahren entfernt. Enzymprotein im Ueberstand wurde damit bei unserer Messung nicht erfasst. Auf die Verwendung von Trypsin wurde deshalb verzichtet. Die Extraktionen mit Ultraschallbehandlung oder Frieren - Tauen in destilliertem Wasser erwies sich als einfachste Aufarbeitung des Zellmaterials. Wir haben aus diesem Grund für

alle weiteren Experimente diese Methode angewendet. Alle Aktivitätsmessungen wurden unmittelbar nach Beendigung der Extraktion ausgeführt.

Der Testansatz für die Lactatoxydation erfolgte nach den Angaben von NEILANDS (19). In Abweichung von der Originalvorschrift wurde an Stelle von Na-DL-Lactat, 25 mM Lithium L(+)Lactat in der gleichen Molarität verwendet*. Verschiedene α-Keto- und αβ-Diketosäuren werden von LDH ebenfalls reduziert. Bezüglich L(+) Konfiguration von α-Hydroxysäuren ist die Spezifität des Enzyms absolut.
Die Messung des reduzierten NADH erfolgte fluorometrisch in 6.0 N NaOH-Lösung bei 366 nm. Die Fluoreszenzemission des NADH wurde bei 460 nm gemessen.

Für die Messung des NADH mittels enzymatic cycling haben wir uns an die Angaben von LOWRY (18) gehalten. Tabelle 2 zeigt die Uebersicht der gesamten analytischen Reaktion. Die Verwendbarkeit der Methode für die gestellte Aufgabe hängt im einzelnen von den folgenden Bedingungen ab:

- Blindwert und Auflösungsvermögen der Messung
- Umfang des auswertbaren Messbereiches

---

* Substrate, Enzyme und Koenzyme für enzymatische Reaktionen wurden, sofern nicht besonders vermerkt, von C.F. Boehringer, Mannheim, bezogen. Für die Herstellung der Pufferlösungen und Reagenzien verwendeten wir Merck Präparate in p.a. Qualität. Der Ansatz der Lösungen erfolgte mit zweifach quarzdestilliertem Wasser.

- Reproduzierbarkeit der Messung
- Vergleichbarkeit mit anderen Messmethoden

Die Zusammensetzung des Blindwertes der gesamten Reaktion ist aus Tab. 3 ersichtlich.
Die handelsüblichen LDH Suspensionen enthielten meist zu hohe Anteile an NAD. Durch Kohlebehandlung kann eine Reduktion des NAD-Anteils von 8×10^{-4} auf 8×10^{-5} Mol/kg Protein erzielt werden (20)*. Bei der Verwendung von kohlebehandelten Enzymsuspensionen war der Blindwertanteil des Cycling-Ansatzes von der Reaktionszeit unabhängig. Eine Kontamination der zugefügten LDH-Suspension mit NAD konnte damit ausgeschlossen werden. Die Fluoreszenzaequivalente der restlichen Blindwertkomponenten sind sehr gering. Das von uns gemessene Fluoreszenzaequivalent des Cycling-Ansatzes von 10×10^{-13} Mol NADH entspricht dem Pyruvatgehalt des verwendeten Lactats**. Verschiedene andere von uns geprüfte Lactat-Präparate enthielten durchwegs höhere Pyruvatanteile. Damit wird der Erfassungsbereich der Methode erheblich eingeschränkt.

---

* Kohlebehandelte Enzymsuspensionen wurden uns von der Firma Boehringer, Mannheim, zur Verfügung gestellt. Angaben über den NAD-Gehalt des Präparates konnten vom Hersteller nicht gemacht werden.

** Abweichend von der Originalvorschrift verwendeten wir L(+)Lactic Acid Lithium Salt, Grade L-X, Lot 48B-0120, SIGMA St. Louis U.S.A. Das eingewogene Lactat wurde unmittelbar vor Herstellung des cycling-Ansatzes in Tris Puffer 0.2 M, pH 8.4 gelöst. Die Bestimmung der Lactatkonzentration erfolgte photometrisch nach HOHORST (21).

Vor dem Einführen des Inkubationsansatzes in die cycling Reaktion müssen 10^{-9} Mol/ml NAD vollständig zerstört werden. Durch Zugabe eines Ueberschusses von 0.02 N NaOH mit anschliessendem Erhietzen auf 60°C für 10 Min. sollen nach LOWRY (18) 99,99% NAD ohne Verluste an NADH zerstört werden. In einer neueren Arbeit von MATSCHINSKY (22) wird darauf hingewiesen, dass eine vollständige Zerstörung hoher NAD-Konzentrationen problematisch ist.

Unsere Messungen ergaben für einen NAD-Ansatz von 10^{-9} Mol absolut nach Alkalibehandlung eine Restfluoreszenz von 10^{-13} Mol NADH-Aequivalenten gemessen mittels enzymatic cycling. Für die vollständige Zerstörung von NAD oder NADH, die durch Zugabe von Alkalien oder Säuren erfolgte, wurden die Ansätze nach dem Erhitzen auf 0°C abgekühlt und kurz zentrifugiert. Spuren von NAD oder NADH an den Wänden der Reaktionsgefässe, die nicht in Kontakt mit dem entsprechenden Agens gelangen, können das Resultat der Messung entscheidend verfälschen.

Um eine Kontamination der Konstriktionspipetten mit NAD oder NADH zu vermeiden, wurden diese nach 15 Min. Auskochen in halbkonzentrierter Salpetersäure in bidestilliertem Wasser gespült und mit einer 2% wässrigen Siliconlösung behandetl. Das Einbrennen der Siliconschicht erfolgte bei 180°C. Die siliconisierten Pipetten wurden nach jedem Gebrauch in 0.1 N NaOH eingestellt, in 0.1 N HCl gespült und über destilliertes Wasser, Aethanol in Aceton getrocknet.

Eichlösungen

Für die Eichung der cycling Reaktion wurden NADH und Pyruvat-Eichlösungen verwendet. Die Haltbarkeit von NADH-lösungen ist sehr beschränkt. Die Eichlösungen wurden deshalb für jede Messung frisch zubereitet. Ausführliche Angaben über die Stabilität von Pyridinnucleotiden in Lösung finden sich bei LOWRY (23). Eingewogene Proben von lyophilisiertem NADH* zu 0.2 mg wurden in 0.02 N NaOH bei $0^{o}C$ gelöst. Die Extinktion der Stammlösung wurde bei 366 nm photometrisch bestimmt und der Korrekturfaktor ermittelt. Das eingewogene Pyruvat wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und enzymatisch bestimmt (24).

Bei allen Messungen wurden beide Eichlösungen mitgeführt. Dies erlaubte eine Bestimmung der cycling Rate und gleichzeitig eine Kontrolle des gesamten Reaktionsverlaufes. Der nicht lineare Verlauf der Eichkurve (Fig. 3) ist auf das Gleichgewicht Lactat ⟶ Pyruvat im cycling-Ansatz zurückzuführen. Das Reaktionsprodukt Pyruvat ist zur NADH-Konzentration nicht proportional. Aus diesem Grund wurden für den gesamten Messbereich Eichlösungen in Schritten von 2×10^{-12} Mol NADH mitgeführt.
Eine ausführliche kinetische Betrachtung dieser Reaktion findet sich bei LOWRY (18).

---

* β-NADH Stat Pack 0.2 mg/vial 321302 CALBIOCHEM
Los Angeles, Calif. 90054

Isolation von Einzelzellen

Für die Isolation der Einzelzellen wurde ein Zeiss-Umkehrmikroskop* benutzt. An Stelle eines Phasenkondensors wurde eine Phasenblende in die Leuchtfeldebene des Beleuchtungsteils eingeführt. Dies ermöglicht freie Manipulationen in der Kulturschale bei gleichzeitiger Beobachtung mit Phasenkontrast. Der freie Arbeitsabstand beträgt minimal 25 mm bei einer numerischen Appertur von 0,75.

Die Isolation der Zellen erfolgte mit Hilfe von Kapillaren. Es wurden handelsübliche Hämatokritröhrchen verwendet, die zu einer feinen Spitze ausgezogen wurden. Kapillaren mit einer freien Oeffnung von 15 - 20 µ haben sich für die Isolation einzelner Zellen, die aus freier Hand erfolgte, am besten bewährt. Die Fibroblasten sind in der Mitose stark abgekugelt und können in diesem Zustand auch aus konfluenten Kulturen leicht abgesogen werden. Die Zellen wurden anschliessend in Tris-Citrat-gepufferter Hanks Lösung gewaschen, mit einer Kapillarpipette einzeln auf eine Mikrotestplatte** übertragen, mit Paraffinoel überschichtet und bei 0°C bis zur Inkubation aufbewahrt. Bei der mikroskopischen Kontrolle mit Phasenkontrast

---

* Zeiss Standard Typ UPI, Phasenblende II

** DISPOSO-Tray Mod. FB 48 GATEWAY International, Los Angeles, Calif. 90005

wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die isolierten Zellen unverletzt waren und keine sichtbaren morphologischen Veränderungen zeigten.

Inkubationsschritt: Lactatoxydation

Unter optischer Kontrolle wurden jeder Zelle 1 ul Substratlösung hinzugefügt. Die Substrattropfen auf der Mikrotestplatte wurden anschliessend im Wasserbad bei 25°C 30 Min. inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Ueberschusses an 0.02 N NaOH beendet und während 15 Min. auf 60°C erhitzt.

Die Verhältnisse Lactat - Pyruvat und NAD — NADH sind für den Reaktionsverlauf bestimmend. Die Substrate Lactat und Pyruvat sowie das Reaktionsprodukt NADH sind bei pH 10.0 stabil. NAD hat im pH-Bereich 2-7 eine niedere Zerfallsrate. Der Verlust eines Protons bei pH-Werten 7 bewirtk einen rapiden Anstieg der NAD-Zerfallsrate (22). Aus methodischen Gründen (vergl. S.10) mussten wir die NAD-Konzentration des Inkubationsansatzes möglichst klein wählen (10^{-3} M). Dies hat zur Folge, dass durch geringe Verluste von NAD bei pH 10.0 das Enzymgleichgewicht gestört werden kann (vergl. K_M für NAD S. 16). Die Lactatoxydation verläuft unter diesen Bedingungen nicht linear (Fig. 2). Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet das Reaktionsprodukt NADH/30 Min. auf

International units (IU = mol min^{-1} at 25°C) umzurechnen. Um zu prüfen, ob innerhalb des Messbereiches (Fig. 3) NADH zu der LDH-Aktivität proportional war, verfolgten wir den Reaktionsverlauf mit einer konstanten Reaktionszeit von 30 Min. in Abhängigkeit der LDH-Aktivität. Die LDH-Aktivitäten wurden so gewählt, dass das Reaktionsprodukt NADH 10^{-11} Mol nicht überstieg. Unter diesen Bedingungen war NADH im Bereich von 2 - 9 x 10^{-2} Mol proportional zur Aktivität (Fig. 4). Mit einer Inkubationszeit von 30 Min. konnten sämtliche LDH-Aktivitäten von Zellen in der Mitosephase auf der Eichkurve (Fig. 3) abgelesen werden.

E R G E B N I S S E

Prüfung der Methode

Aus Kulturansätzen nicht synchronisierter Passagen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurde die mittlere LDH-Aktivität gemessen. Die Aktivität der Zellsuspensionen wurde fluorometrisch bestimmt (18). In Tabelle 1 werden die Resultate der beiden Messmethoden miteinander verglichen. Der Mittelwert von 80 Einzelzellmessungen zeigt eine sehr gute Uebereinstimmung mit dem Mittelwert der Aktivitätsbestimmungen von

Zellextrakten, der auf Einzelzellen umgerechnet wurde. Die Standardabweichung der Mikromethode ist, trotz tausendfach erhöhter Messempfindlichkeit nur etwa doppelt so gross, verglichen mit der Standardabweichung der Makromessung.
Dass mit der Mikromethode durchwegs etwas höhere LDH-Aktivitätswerte gemessen wurden, dürfte auf das unterschiedliche Extraktionsverfahren zurückzuführen sein. Bei der Mikrobestimmung wurden die Einzelzellen in 1 µl Glycin-NaOH-Puffer 0.1 M pH 10.0 aufgeschlossen, wobei eine ausreichende Durchmischung gewährleistet ist. Im Fall der LDH wird dieser Vorgang dadurch begünstigt, dass das Enzym in der löslichen Phase des Zytoplasmas vorliegt (25). Da der gesamte Extraktionsansatz unmittelbar für die Messung verwendet wurde, können Aktivitätsverluste, die durch Zentrifugation und andere Extraktionsschritte hervorgerufen werden, ausgeschlossen werden.

Die LDH-Aktivitätsmessungen von DELUCA (2), die an synchronisierten Massenkulturen menschlicher Fibroblasten ausgeführt wurden, haben wir für einen Vergleich auf Einzelzellen umgerechnet (Tab. 1). Die von uns ermittelten Enzymwerte einzelner Fibroblasten stimmen mit diesen Angaben gut überein.

Erfassungsbereich der Methode

Der Gesamtblindwert der Methode unter Anwendung des enzymatic cycling beträgt $1.40 \pm 0.25 \times 10^{-12}$ Mol NADH Fluoreszenzaequivalente (Tab. 3). Bei der Verwendung der entsprechenden Eichlösungen kann der Messbereich der Methode mit einer unteren Erfassungsgrenze von 5×10^{-13} Mol bis 2×10^{-11} Mol NADH ausgedehnt werden. Die LDH-Aktivität einzelner Fibroblasten kann damit bei Anwendung kurzer Inkubationszeiten quantitativ erfasst werden.

Michaelis Konstanten der Lactatdehydrogenase

Die Michaeliskonstanten der LDH aus Kulturen der Zellinie BCHL betragen für L(+)Lactat $K_{ML} = 3.3 \times 10^{-3}$ (NAD = 10^{-4} M) und für NAD $K_{MNAD} = 10^{-4}$ (Lactat = 2.5×10^{-1} M).

Für LDH aus Rattenleber wurden von GIBBSON (26) die folgenden Werte angegeben: $K_{ML} = 1.96 \times 10^{-2}$ (NAD = 8.8×10^{-5} M) und $K_{MNAD} = 2.55 \times 10^{-4}$ (Lactat = 1.3×10^{-1} M).

Wachstumscharakteristik

Der Wachstumszyklus der Zellinie BCHL lässt sich in drei Phasen unterteilen (Fig. 5): eine lag-Phase, eine präkonfluente Phase mit logarithmischer Zellvermehrung (=log-Phase) und eine postkonfluente Phase (=Plateau).

Die Dauer der lag-Phase ist abhängig von der Zellkonzentration im Kulturansatz. Eine Erhöhung der Zellkonzentration bewirkt eine Verkürzung der lag-Zeit. Sie ist weiter abhängig von der Zyklusphase der Stammkultur, die für den Ansatz verwendet wird. Die kürzeste lag-Zeit wurde bei der Verwendung von Stammkulturen in logarithmischer Wachstumsphase gemessen. Schliesslich wurde mit zunehmender Passagenzahl eine zusätzliche Verkürzung der lag-Zeit beobachtet. Die kürzesten lag-Zeiten wurden in den Passagen 59 und 60 mit 29 Std. gemessen. Die Dauer der präkonfluenten log-Phase betrug 30-50 Std. Nach 70-96 Std. begann die Wachstumskurve abzuflachen. Eine Abnahme des pH-Wertes des Kulturmediums von 7.4 bis 6.8 wurde erst ca. 50 Std. nach Eintritt der Kultur in das Plateau der Wachstumskurve gemessen.
Die Generationszeit, gemessen in der log-Phase, betrug 8-9 Std. Diese blieb über den Verlauf des ganzen Experimentes unverändert (Passagen 43-60). Die Generationszeiten, die von HSU (27) und KLEVECZ (4) für Chinesische Hamsterfibroblasten angegeben werden betragen 11.0 - 11.5 Std. Die drei Wachstumsphasen lassen sich auch morphologisch gut voneinander unterscheiden. Die in der lag-Phase einzeln attachierten Zellen beginnen mit eintretender log-Phase zunehmend ausgeprägte Inseln zu bilden. Die Proliferation dieser Inseln findet vorwiegend an deren Peripherie statt (Fig. 6)

LDH-Aktivität in Abhängigkeit vom Kulturwachstum

In Vorversuchen wurde ein Zusammenhang zwischen der LDH-Aktivität und dem Kulturwachstum festgestellt, der von in der Literatur beschriebenen Beobachtungen abwich (1, 2,3,6). Der Verlauf der LDH-Aktivität einer Passage wurde deshalb über einen ganzen Wachstumszyklus verfolgt (Fig. 5). Für jede Messung wurden Fibroblasten mit morphologisch eindeutig identifizierbarer Metaphaseplatte isoliert (Fig. 6). Die ersten Messungen erfolgten 26 Std. nach Ansetzen der Kultur, beim Auftreten der ersten Mitosen. Die Enzymmittelwerte in der lag- und der log-Phase, zwischen 26-27 Std. nach Ansatz der Kultur, waren nicht signifikant voneinander verschieden. Mit beginnender Abflachung der Wachstumskurve wurden niederere Enzymwerte gemessen. Die Enzymwerte nach 72 und 96 Std. sind signifikant* tiefer als die Werte, die zwischen 26 und 57 Std. im logarithmischen Abschnitt der Wachstumskurve gemessen wurden.

Für die Ausführung der folgenden Experimente haben wir deshalb ausschliesslich unsynchronisierte Kulturen in logarithmischer Wachstumsphase verwendet. Dieser Abschnitt des Kulturwachstums bietet für Vergleichsmessungen der Enzymaktivität einzelner Zellen günstige Bedingungen.

---

* Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.01$
Die statistische Sicherung erfolgte mit dem X-Test von VAN DER WAERDEN und NIEVERGELT (28)

LDH-Aktivität* in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Die LDH-Aktivität von 96 Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Isolation in nicht definierter Phase des Zellzyklus befanden, wurden in Grössenklassen eingeteilt und nach Häufigkeit aufgetragen (Fig. 7). Der arithmetische Mittelwert ($\bar{a}$=5.37) und der häufigste Wert liegen in der Grössenklasse 5-6. Der Mittelwert $\bar{a}$ wird in Tabelle 1 den Resultaten von Enzymmessungen von Zellextrakten gegenübergestellt.

Die Enzymwerte von 80 Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Isolation in der Mitose befanden, wurden ebenfalls in Figur 7 aufgetragen. Aus der graphischen Darstellung ist bereits ersichtlich, dass sich die beiden Häufigkeitsverteilungen deutlich voneinander unterscheiden. In der Verteilung der Enzymwerte von Zellen in der Mitose fallen arithmetischer Mittelwert ($\bar{a}$=3.1) und häufigster Wert in die Grössenklasse 3-4. Die Streuung der Enzymwerte ist deutlich eingeschränkt. Wir schliessen daraus, dass die Enzymaktivität von der Zyklusphase der Zellen beeinflusst wird.

Die Häufigkeitsverteilung der Enzymaktivitätswerte von Zellen in der Mitose ist annähernd symmetrisch. Mittelwert, häufigster Wert und Zentralwert (m=3.4) fallen alle in die Grössenklasse 3-4. Dagegen ist die Zahl der

---

* Aktivität in 10^{-12} Mol NADH/30 Min. bei 25°C

Zellen, die in die Gruppe 6-7 fallen, gegenüber den beiden angrenzenden Gruppen signifikant* erhöht. Eine Variation der Klassenbreite bewirkte keine grundsätzliche Veränderung dieser Verteilung. Es scheint hier eine zweigipflige Verteilung mit einem Maxiumum zwischen 3 und 4 und einem zweiten, kleineren Maximum zwischen 6 und 7 vorzuliegen. Die Tatsache, dass das Verhältnis der beiden Maxima 1:2 beträgt, bestärkte uns in der Vermutung, dass es sich hier um die Enzymwerte diploider und tetraploider Zellen handeln könnte. Auf Grund von Kerngrössenmessungen konnten wir in BCHL-Klulturen einen Anteil von 7% tetra- oder höher-ploider Zellen ermitteln.

LDH-Aktivität verschiedener Zellpopulationen

Die Standardabweichung der LDH-Aktivitätswerte von Zellen in der Mitose ist recht gross ($s = \pm 2.6$, vergl. Häufigkeitsverteilung Fig.7). Die Stichprobe (n=80 Zellen) umfasste Zellen der Passagen 53-60. Um zu prüfen, ob die Standardabweichung von der Passagenzahl beeinflusst wurde, haben wir die Mittelwerte und die Standardabweichungen der verschiedenen Passagen miteinander verglichen (Fig. 4). Dabei konnten auch innerhalb der Passagen 55 und 60 deutliche Schwankungen von Mittelwert und Standardabweichung gefunden werden. Eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Passagenzahl ist aus dieser Zusammenstellung jedenfalls

* Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.02$

nicht ersichtlich. Wir vermuten, dass innerhalb der verwendeten Population Zellen mit unterschiedlichen LDH-Aktivitätswerten vorlagen. Bei dieser Population handelte es sich um Zellen einer aneuploiden Zellinie (17). Ein Zusammenhang zwischen LDH-Aktivität und Karyotyp der Zellen könnte für die beträchtliche Streuung der Enzymwerte innerhalb der Populationen eine Erklärung bieten. Für eine andere Interpretation unserer Befunde sprechen die Ergebnisse von RUDDLE (6). Ruddle hat mit histochemischen Methoden die LDH-Aktivität einzelner Zellen in auswachsenden Monolayerkulturen untersucht. Seine Messungen deuten darauf hin, dass die LDH-Aktivität von der Lage der einzelnen Zellen in den auswachsenden, zweidimensionalen Zellinseln beeinflusst wird. Da wir für unsere Messungen die Zellen zufällig, ohne Berücksichtigung ihrer Lage im Zellverband isoliert haben, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Versuchsgruppen (Tab.4) um Stichproben bezüglich LDH-Aktivität heterogener Zellpopulationen handelte.

Für die Ausführung der folgenden Experimente haben wir die Tatsache ausgenützt, dass die verwendete Zellinie BCHL ausgesprochen klonale Wachstumseigenschaften aufweist (Fig. 6). Die einzelnen, attachierten Zellen bilden im Verlauf des Kulturwachstums kleine Inseln, die anfänglich deutlich voneinander abgesetzt sind. Erst im

Plateau des Kulturwachstums bilden die Zellen eine konfluente Schicht. Damit bot sich uns eine einfache Möglichkeit die LDH-Aktivität verschiedener Populationen innerhalb einer Zellkultur zu messen.

LDH-Aktivität verschiedener Zellinseln ("Klone")

Pro Kultur wurden 10^3 Zellen in 5 ml Kulturmedium in Petrischalen angesetzt. Die attachierten Einzelzellen wurden mit einem Tuschetropfen auf der Unterseite der Petrischale markiert. Nach fünf Tagen hatten sich die Zellinseln soweit entwickelt, dass an ihrer Peripherie zahlreiche Mitosen isoliert werden konnten. Eine Abgrenzung der auswachsenden Zellinseln ist in diesem Stadium des Kulturwachstums gewährleistet(Fig. 6) doch kann eine Kontamination mit Zellen benachbarter Inseln durch Wanderung der Fibroblasten oder Abschwimmen von Mitosestadien nicht ausgeschlossen werden. Wir sind deshalb nicht sicher, ob es sich bei diesen Zellinseln um reine Klone handelte.

In Tab. 5 geben wir eine Uebersicht der in der Passage 60 ermittelten Enzymmittelwerte verschiedener Zellinseln. Der Mittelwert mit Standardabweichung der fünf Messgruppen beträgt $\bar{a}=3.50 \pm 0.75$ und stimmt gut überein mit den entsprechenden Werten der zehn Messgruppen aus den Passagen 53-60 (Tab. 4, $\bar{a}=3.66 \pm 0.80$). Die Standardabweichungen der Messwerte der einzelnen "Klone" sind signifikant* kleiner als die Werte der unklonierten Messgruppen (Tab. 4)

* Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.01$

Deutliche Unterschiede zeigen auch hier die Mittelwerte der einzelnen "Klone" untereinander. Da wir bei diesen Experimenten alle Zellen aus nicht konfluenten Zellinseln aus deren Peripherie isoliert haben, scheint es uns unwahrscheinlich, dass die beobachtete Einschränkung der Streuung mit der Lage der einzelnen Zellen im Verband zusammenhängt (6); es sei denn, dass die Aktivität durch andere Faktoren beeinflusst wurde, die mit der Verteilung der Zellen in der Kulturschale zusammenhängen.

Die verschiedenen Mittelwerte, sowie die Einschränkung der Standardabweichung innerhalb der einzelnen Zellinseln, bestärken uns in der Annahme, dass es sich bei diesen Zellinseln um Klone handelte, die sich von Zellen mit unterschiedlicher LDH-Aktivität ableiteten. Ob es sich dabei um diploide und tetraploide Populationen handelte, können wir auf Grund unseres Zahlenmaterials nicht entscheiden. Es ist möglich, dass die verschiedenen Karyotypen dieser aneuploiden Zellinie (17) unterschiedliche LDH-Aktivitäten aufweisen. Die cytologische Analyse der Karyotypen verschiedener Klone könnte hier weiteren Aufschluss geben.

D I S K U S S I O N

Enzymmessungen, die an synchronisierten Massenkulturen ausgeführt wurden, zeigten, dass Enzymaktivitäten im Verlauf des Zellzyklus charakteristischen Schwankungen unterliegen können. Bei heteroploiden, etablierten Zellstämmen wurde bei verschiedenen Enzymen ein übereinstimmendes Verhalten beobachtet. Die Aktivität nahm in der G_1- und S-Phase kontinuierlich zu, erreichte ein Maximum in der S-Phase und nahm in der G_2-Phase wieder ab (3,29,30,31,32).

Ein anderes Verhalten wurde bei euploiden Zellstämmen beobachtet. KLEVECS (4,5) zeigte, dass LDH und Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase innerhalb eines Zellzyklus drei Aktivitätsmaxima aufweisen. In einer weiteren Arbeit wurde der Nachweis erbracht, dass diese Aktivitätsmaxima der LDH und der Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase durch intermittierende Synthese der betreffenden Proteine hervorgerufen werden (5). Die intrazelluläre Halbwertszeit der LDH betrug 2.0 - 2.5 Std.

Die unterschiedliche Häufigkeitsverteilung der LDH-Aktivitäten von Zellen in der Mitose und in nicht definierter Phase des Zellzyklus, wie sie von uns

beobachtet wurde (Fig. 7), war zu erwarten. Um vergleichbare Einzelzellwerte zu erhalten muss die Zykluspha se der einzelnen Zellen berücksichtigt werden. Die Enzymaktivitäten, die in der Mitose gemessen wurden, sind das Resultat von Synthese und Degradation des betreffenden Enzyms. Die Aktivität kann in dem Zeitabschnitt zwischen Enzymsynthese und Messung in der Mitose noch zusätzlich durch intrazelluläre Aktivatoren und Inhibitoren verändert werden. Eine allosterische Regulation der LDH-1 aus Kaninchenmuskeln durch verschiedene Substrate wurde von FRITZ (33) beschrieben. Von KLEVECZ (4,5) wurde zwei Stunden vor der Mitose eine hohe LDH-Syntheserate gemessen. Bei einer konstanten Halbwertszeit von 2.0 - 2.5 Std. wären in der Mitose etwa 50% der maximalen Aktivität zu erwarten. Die Werte, die von KLEVECZ angegeben werden, liegen in der Grössenordnung von wenigen Prozenten. Mit der Annahme einer zusätzlichen, der Degradation des Enzyms überlagerten Regulation, könnten diese tiefen Mitosewerte erklärt werden. Die von uns an Einzelzellen gemessenen LDH-Aktivitäten betragen in der Mitose 25 - 50% der maximalen Aktivität (Fig. 7) und sprechen gegen die Annahme einer der Degradation überlagerten Regulation des Enzyms zwischen Enzymsynthese und Mitose

DELUCA (2) hat die LDH-Aktivität in Abhängigkeit des

Wachstumszyklus einer unsynchronisierten, etablierten Zellinie beschrieben. Einem Anstieg der Aktivität in der lag-Phase folgt eine charakteristische Abnahme, die zeitlich mit dem Beginn des logarithmischen Wachstums zusammenfällt. Ein Zusammenhang mit dem Glucoseverbrauch oder der Lactatakkumulation im Medium konnte nicht gezeigt werden. Das Auftreten eines Inhibitors, eine Repression der Enzymsynthese, sowie ein Verlust des Enzyms aus dem Zytoplasma in das Medium wurde von den Autoren ausgeschlossen. Nicht geprüft wurde die Möglichkeit einer intrazellulären Zerstörung des Enzyms.

Auf Grund theoretischer Ueberlegungen (34) und der Resultate von KLEVECZ (4,5) können wir annehmen, dass in der Mitose die LDH-Aktivität gegenüber den Werten in den anderen Abschnitten des Zellzyklus erniedrigt ist. Dies veranlasste uns die Hypothese aufzustellen, dass der von DELUCA (2) beobachtete Abfall der LDH-Aktivität auf die in der logarithmischen Wachstumsphase prozentuale Zunahme an enzymatisch weniger aktiven Zellen in der Mitose zurückgeführt werden könnte. Die Resultate unserer Messungen unterstützen diese Hypothese. Bei der Verwendung definierter Mitosestadien wurde in der logarithmischen Wachstumsphase keine signifikante Veränderung der LDH-Aktivität festgestellt (Fig. 5). Gegen diese Interpretation spricht, dass

von DELUCA, abweichend von den Ergebnissen bei der LDH, für das Enzym Glucose-6-phosphat-dehydrogenase eine kontinuierliche Zunahme der Aktivität gemessen wurden. Auf Grund eigener Messungen nehmen wir an, dass unter den von ungewählten Bedingungen, die logarithmische Wachstumsphase für die Bestimmung von LDH-Aktivitäten einzelner Zellen eine günstige Voraussetzung bietet.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Eine Methode für die Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität einzelner Fibroblasten wird beschrieben. Die enzymatische Lactat-Oxydation wurde mit einer fluorometrischen Mikrobestimmung für Pyridinnucleotide verbunden. Damit konnten 5 x 10^{-13} Mol reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid quantitativ erfasst werden. Die gemessenen Enzymwerte einzelner Zellen stimmen mit den Resultaten von Makrobestimmungen gut überein.

Es wurde eine aneuploide, etablierte Zellinie BCHL (chinesischer Hamster) verwendet. Die Karyotypen waren x = 23, 24 und 26. Die Generationszeit der Zellinie betrug 8 - 9 Std. in der logarithmischen Wachstumsphase.

Einzelne Fibroblasten in der Mitosephase wurden aus nicht synchronisierten Kulturen mit Mikrokapillaren isoliert. Die LDH-Aktivität der einzelnen Zellen wurde in Abhängigkeit vom Kulturwachstum verfolgt. Die Aktivitätswerte der einzelnen Zellen blieben während der logarithmischen Wachstumsphase der Kultur unverändert. Mit beginnender Abflachung der Wachstumskurve wurde eine signifikante Erniedrigung der LDH-Aktivität der einzelnen Zellen gemessen.

Die Enzymaktivität einzelner Zellen in der Mitose und in nicht definierter Phase des Zellzyklus wurde vergleichend untersucht. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Einzelzellwerte von Fibroblasten in der Mitosephase betrug $a = 3.1 \pm 2.6 \times 10^{-12}$ Mol NADH/30 Min. Die mittlere Aktivität einzelner Zellen in der Mitose betrug 50% der Spitzenaktivität im Verlauf des Zellzyklus. Die Einzelzellwerte der Fibroblasten, die aus zusammenhängenden, klonal wachsenden Zellinseln isoliert wurden, zeigten gegenüber den Werten beliebig verteilter Zellen signifikant kleinere Standardabweichungen $s = \pm 0.42 - \pm 1.18$.
Ein Polymorphismus hinsichtlich LDH-Aktivität in den Populationen der Zellinie BCHL wird diskutiert.

L I T E R A T U R

1) Liebermann I., Abrams R., Hunt N., Ove P. (1963)
Levels of enzyme activity and deoxyribonucleic acid synthesis in mammalian cells cultured from the animal
J.Biol.Chem. 238,3955

2) DeLuca C., Nitowsky H.M. (1964) Variations in enzyme activities during the growth of mammalian cells in vitro. Lactate and Glucose-6-phosphate Dehydrogenase
Biochim.Biophys.Acta 89,208

3) Bello L.J. (1969) Studies on gene activity in synchronized cultures of mammalian cells
Biochim.Biophys.Acta 179,204

4) Klevecz R.R., Ruddle F.H. (1968) Cyclic changes in enzyme activity in synchronized mammalian cell cultures
Science 159,634

5) Klevecz R.R. (1969) Temporal order in mammalian cells. The periodic synthesis of lactate dehydrogenase in the cell cycle
J.Cell Biol. 43,207

6) Ruddle F.H., Rapola J. (1970) Changes in lactate dehydrogenase and esterase-specific activities, isozymic patterns, and cellular distribution during the growth cycle of PK cells in vitro
Exptl.Cell Res. 59,399

7) Uno H., Adachi K., Hu F. (1969) Enzyme activities of the epithelial outgrowth of the hair follicles in tissue culture
Exptl.Cell Res. 56-58,640

8) Elson D. (1967) Ribosomal enzymes
Enzyme Cytology (ed. by D.B. Roodyn) pp.407
Academic-Press London

9) Keck K., Choules E.A. (1962) The differential binding of Lactatdehydrogenase (LDH) Isozymes to ribonucleoprotein particles
Archs.Biochem.Biophys. 99,205

10) Georgiev G.P. (1967) The nucleus
Enzyme Cytology (ed. by D.B. Roodyn) pp.27
Academic-Press London

11) Vesell E.S. Bearn A.G. (1962) Localization of a lactic dehydrogenase isozyme in nuclei of young cells in the erythrocyte series
Proc.Soc.exp.biol.Med. 111,100

12) Paul J. (1970) Cell and Tissue Culture pp.36
E.S. Livingstone Edinburgh London

13) Adebonojo F.O. Bensch K.G. King D.W. (1961) The effect of nitrogen on the enzymatic pattern of strain L-cells
Cancer Res. 21,252

14) Papaconstantinou J., Colowick S.P. (1961) The role of glycolysis in the growth of tumor cells
J.Biol.Chem. 236,285

15) Ernster B.B. Ernster L. Navazio F. (1957) Studies on TPN-linked oxydations. II The quantitative significance of liver lacticdehydrogenase as a catalyzer of TPN-oxydation
Biochim.Biophys.Acta 26,416

16) Ham R.G. (1963) An improved nutrient solution for diploid chinese hamster and human cell lines
Exptl.Cell Res. 29,515

17) Staiger H.R. Mündliche Mitteilung

18) Lowry O.H., Passonneau J.V., Schulz D.W., Rock M.K. (1961) The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling
J.Biol.Chem. 236,2746

19) Meilands J.B. (1962) Lacticdehydrogenase of heart muscle.
Methods in Enzymology Vol. 1 (ed. by Colowick S.P., Kaplan N.O.) pp.449. Academic-Press New York

20) Neilands J.B. (1952) Studies on lacticdehydrogenase of heart
J.Biol.Chem. 199,373

21) Hohorst H.J. (1965) L-(+)-Lactate. Determination with lactic dehydrogenase and DPN.
Methods of Enzymatic Analysis (ed. by H.U. Bergmeyer) pp.266, Academic-Press New York

22) Matschinsky F.M., Passonneau J.V., Lowry O.H. (1968) Quantitative histochemical analysis of glycolytic intermediates and cofactors with an oil well techniques J.Histochem.Cytochem. 16,29

23) Lowry O.H., Passonneau J.V., Rock M.K. (1961) The stability of pyridine nucleotides J.Biol.Chem. 236,2756

24) Bücher T., Czok R., Lamprecht W., Latzko E. (1965) Methods of Enzymatic Analysis (ed. by H.U. Bermeyer) pp.253, Academic-Press New York

25) Lowry O.H., Nira R.R., Mei-Ling W.C. (1956) The analysis of single cells J.Biol.Chem. 222,97

26) Gibbson D.M. (1953) Rat liver lacticdehydrogenase J.Biol.Chem. 203,397

27) Hsu T.C. (1962) Radiosensitivity of cells of chinese hamster in vitro in relation to the cell cycle Exptl.Cell Res. 27,441

28) Van der Waerden B.L., Nievergelt E. (1956) Tafeln zum Vergleich zweier Stichproben mittels X-Test und Zeichentest Springer, Berlin

29) Littlefield J.W. (1966) The periodic synthesis of thymidine kinase in mouse fibroblasts. BiochimBiophys.Acta 144,398

30) Brent T.P., Butler J.A.V., Crathorn A.R. (1965) Variations in phosphokinase activities during the cell cycle in synchronous populations of Hela cells Nature, 207,176

31) Martin D., Tomkins G.M., Granner D. (1969) Tyrosine aminotransferase in synchronized HCT cells. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 62,248

32) Hooper-Conrad A.W., Ruddle F.H. (1968) Regulation of thymidilate synthetase activity in mammalian cells in vitro J.Cell Biol. 39,2,Pt.2,28a

33) Fritz (1967) Rabbit muscle lactatedehydrogenase 5., a regulatory enzyme
Science 150,364

34) Baserga R. (1968) Biochemistry of the cell cycle: a review
Cell Tissue Kinet. 1,167

35) Prescott D.M. (1964) Cellular sites of RNA synthesis. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. pp.33 (ed. by J.N. Davidson and Waldo E. Cohn) Academic-Press New York

Tabelle 1 Vergleich verschiedener Messmethoden und Extraktionsverfahren

Material	Aktivitätsmessung	Extraktionsverfahren 1)	LDH-Aktivität/Zelle 2)
BCHL Passage 53 n=10^3 Zellen STAIGER (17)	nach NEILANDS (19) NADH/Min. 25°C fluorometrisch bei 366nm/460nm	Ablösen der Zellen mit Trypsinlösung 0.25% 3-5', 37°C. Zentrifugation 10', 230g, 0°C. Verwerfen des Ueberstandes. Resuspension der sedimentierten Zellen in 1ml Phosphatpuffer n. Soerensen 100mM, pH 7.0. Aufbrechen der Zellen mit Ultraschall 0°C Zentrifugation 3', 15'000g.	1.16 ± 0.15
		Ablösen der Zellen mit Spatel. Aufnehmen in 1ml Phosphatpuffer n. Soerensen 100mM pH 7.0. Aufbrechen der Zellen mit Ultraschall 0°C. Zentrifugation 3', 15'000g.	4.35 ± 0.15
		Dreimaliges Frieren-Tauen der Kulturschale mit 0.5ml aqua dest. Zentrifugation 3', 15'000g.	4.90 ± 0.15
BCHL Passage 53 n=80 Zellen STAIGER (17)	nach NEILANDS (19) NADH/30 Min. 25°C mit enzymatic cycling	Isolation der Einzelzellen mit Mikrokapillaren. Lyse der Einzelzelle in 1 µl Glycin-NaOH-Puffer 100mM, pH 10.0.	5.37 ± 0.25
Human TE foreskin DELUCA (2)	nach NEILANDS (19) NADH/Min. 25°C Absorption bei 340nm 1cm-Küvette	Behandlung der Kulturen mit Trypsinlösung 0.05%. Frieren-Tauen der Zellsuspension. Ausführliche Beschreibung des Verfahrens bei DELUCA (2).	6 - 9

1) Die Kulturen wurden nach Entfernung des Mediums mit Hankslösung 37°C gewaschen.

2) Alle Messungen wurden umgerechnet auf 10^{-12} Mol NADH reduziert in 30' bei 25°C

Tabelle 2 Uebersicht der LDH-Aktivitätsbestimmung

Reaktion	Komponenten	Konzentration	Volumen	Zeit	°C	pH	Bemerkungen
Vorbereitung der Analysenprobe	Hanks BSS Tris-Citrat-gepuffert pH 7.4	100 mM	0.1µl		0	7.4	Zelle in Hanks-Lösung 37°C suspendieren und in 0.1µl übertragen auf Mikrotestplatte und mit Paraffinöl überschichten
Lactat-oxydation	Li L(+)Lactat NAD Glycin-NaOH-Puffer pH 10.0	250 mM 1 mM 100 mM	1 µl	60'	25	10.0	NAD lösen in 0.02 N HCl (Zerstörung NADH-Anteil des NAD)
Stoppen der Lactat-oxydation	NaOH	0.02 N	10 µl	15'	60	12.0	Stabil für einige Tage bei +4°C
Cycling Reaktion	α-Ketoglutarat Li L(+)Lactat ADP Ammoniumacetat Tris-HCl-Puffer pH 8.4 LDH 1) GLDH 2)	5 mM 100 mM 0.3 mM 5 mM 200 mM 0.06 M/l/Std 0.50 M/l/Std	100 µl	60'	25	8.4	Einführung von 10µl NADH-Eichlösung. Enzyme unmittelbar vor Gebrauch zugeben. Haltbarkeit des Cycling-Ansatzes ohne Enzyme 4 Wochen bei -20°C. Nach Inkubation: Einführung von 10µl Pyruvateichlösung.
Stoppen der Cycling Reaktion				10'	100	8.4	Anschliessend Abkühlung auf 0°C und Zentrifugation 3 Min. 15'000 g.

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Reaktion	Komponenten	Konzentration	Volumen	Zeit	°C	pH	Bemerkungen
Pyruvat-reduktion	NADH Phosphatpuffer pH 6.5 : NaH_2PO_4 K_2HPO_4 LDH 3)	0.01mM 650 mM 150 mM 1.5 ug	100 ul	15'	25	6.2	Vorbehandlung NADH in 0.02 N NaOH 60°C 10' (Zerstörung NAD-Anteil des NADH)
Stoppen der Pyruvat-reduktion	HCl	5.0 N	25 ul	5'	25	7.0	Durchmischung und Zentrifugation 3 Min. 15'000 g
Strong alkali Reaktion	NaOH	6.0 N	500 ul	15'	60	7.0	Vor Licht geschützt auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.
Endvolumen	aqua bidest.		1.5 ml				Fluoreszenz stabil für einige Stunden

1) LDH-H-P, SP, EC 1.1.1.27 aus Schweineherz, kohlebehandelte Kristallsuspension in Ammoniumsulfat-Lösung 2.0 M, pH 6.0

2) GLDH EC 1.4.1.2. aus Rinderleber , kristallsuspension in Ammoniumsulfatlösung 2.0 M, pH ca. 7.0

3) LDH-H-P EC 1.1.1.27 aus Schweineherz, Kristallsuspension in Ammoniumsulfatlösung 2.2 M, pH ca. 6.0.

Tabelle 3 Blindwert-Komponenten

Komponenten	Fluoreszenz*
Inkubationsansatz	3×10^{-13}
- Verunreinigung mit NAD und NADH	
- LDH aus dem Kulturmedium	
- NADH-Anteil des NAD	
- Restfluoreszenz NAD nach Alkalibehandlung	
Cycling-Ansatz	10×10^{-13}
- NAD-Anteil der LDH	
- Pyruvat-Anteil des Li L(+)Lactat	
Pyruvatbestimmung	1×10^{-13}
- NAD-Anteil des NADH	
Gesamtblindwert	14×10^{-13}

* Angaben in Mol NADH Fluoreszenz-Aequivalenten

Tabelle 4 LDH-Aktivität der Passagen 53 - 60 während der Mitose*

BCHL Passage	Mittelwert n = 12	Standard-abweichung
53 - 1	4,74	1,78
53 - 2	3,54	1,61
55 - 1	4,40	1,84
55 - 2	3,70	1,00
55 - 3	3,75	1,45
59 - 1	4,00	1,33
59 - 2	3,80	1,45
60 - 1	2,52	1,18
60 - 2	3,88	1,97
60 - 3	2,30	1,12

Tabelle 5 LDH-Aktivität von Zellinseln aus der Passage 60 während der Mitose*

BCHL Passage 60 "Kone"	Mittelwert n = 8	Standard-abweichung
60 - 1	3,23	0,70
60 - 2	3,50	0,80
60 - 3	4,67	0,42
60 - 4	2,60	1,18
60 - 5	3,50	0,80

*Angaben in 10^{-12} Mol NADH/30' 25°C

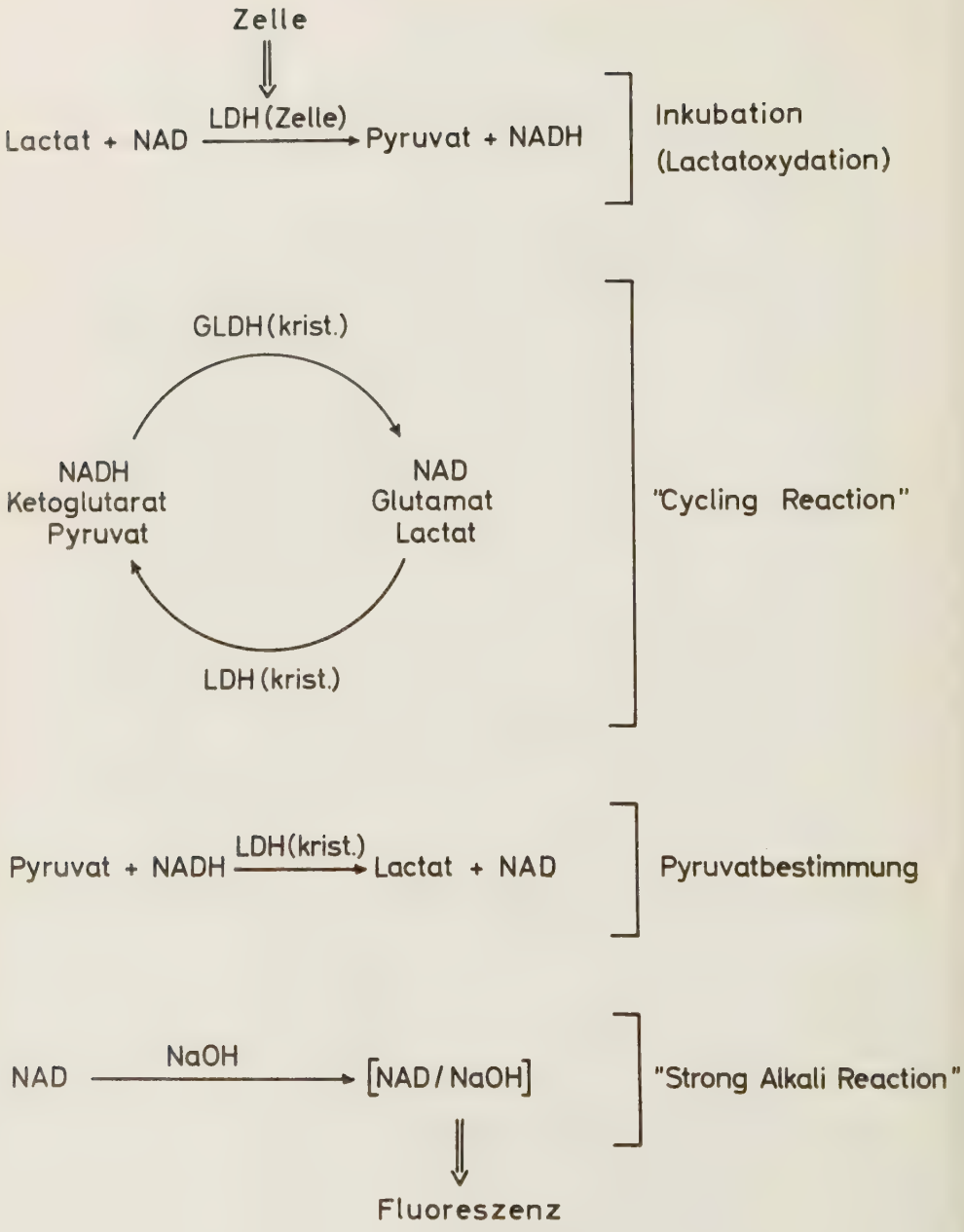

Fig. 1 Prinzip der LDH-Aktivitätsbestimmung mit der "enzymatic cycling reaction".

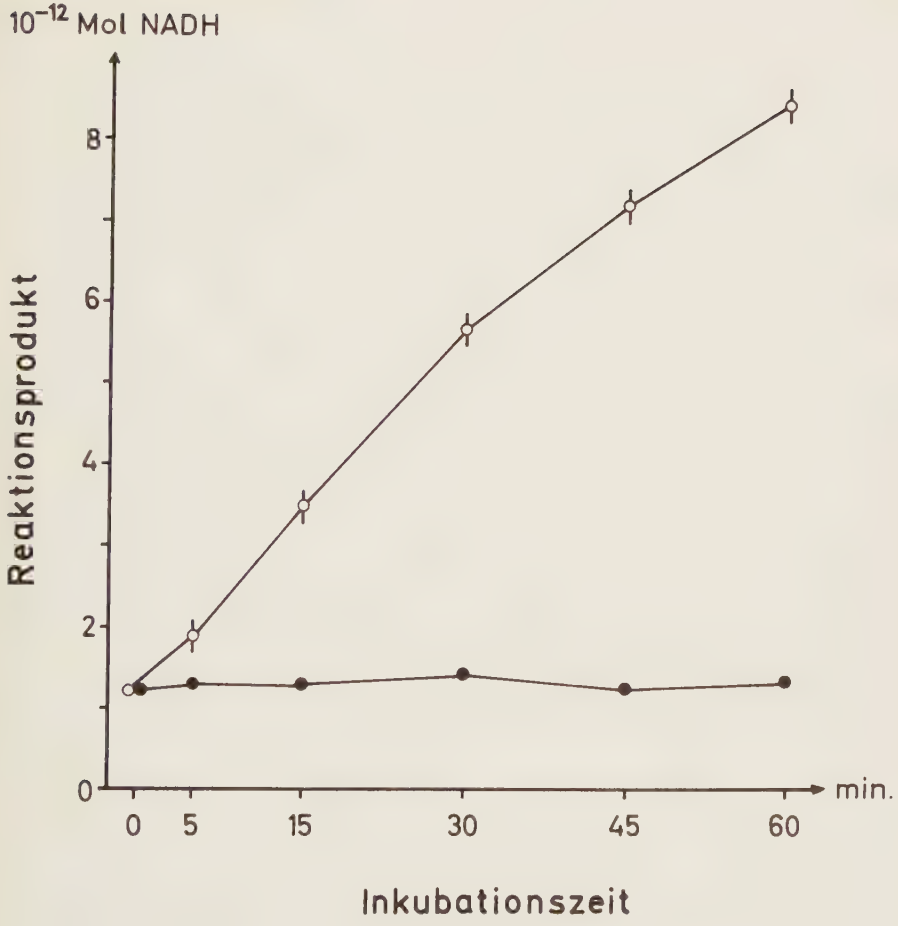

Fig. 2 Reaktionsprodukt der Lactatoxydation in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Mikroansatz mit krist. LDH-H-P. Cycling Faktor 2000x (vergl.S.6)

- o Reaktionsprodukt mit Standardabweichung.
- ● Kontrollen ohne Enzym.

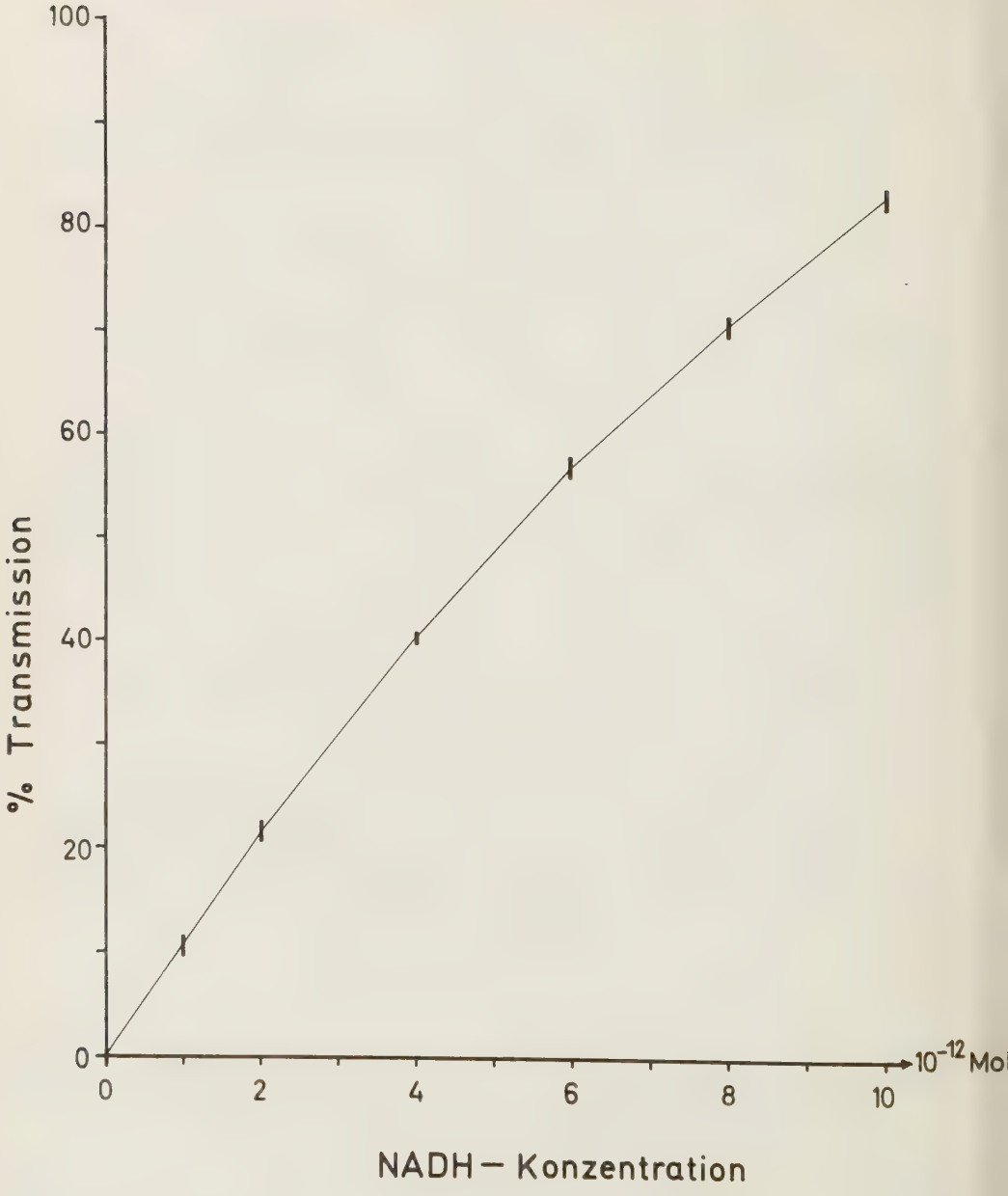

Fig. 3 NADH - Eichkurve gemessen mit "enzymatic cycling"
Standardabweichung der Transmission bei 366 nm
Primär - und 460 nm Sekundärstrahlung.

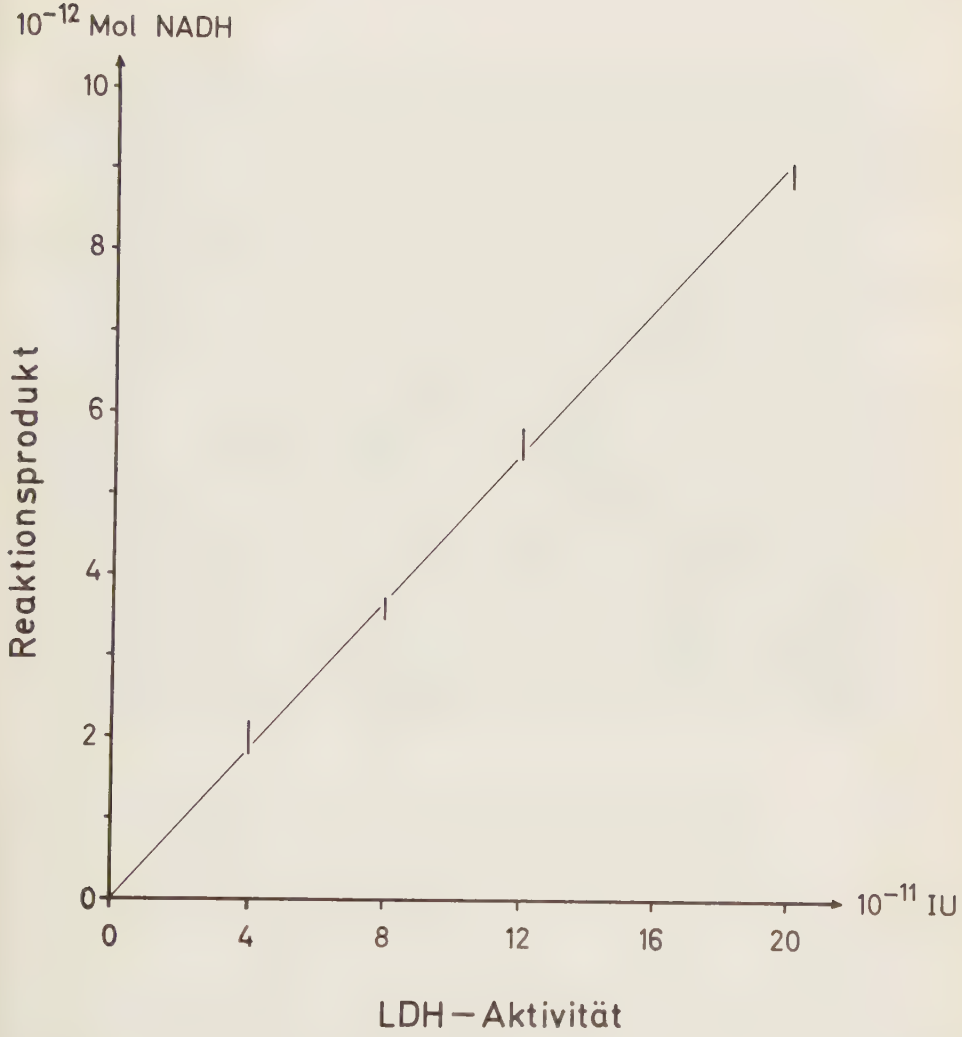

Fig. 4 Reaktionsprodukt der Lactatoxydation in Abhängig - keit der LDH-Aktivität bei konstanter Inkubations- zeit von 30 Min. Mikroansatz mit krist. LDH-H-P. Cycling Faktor 2000x (vergl.S.6)

| Reaktionsprodukt mit Standardabweichung

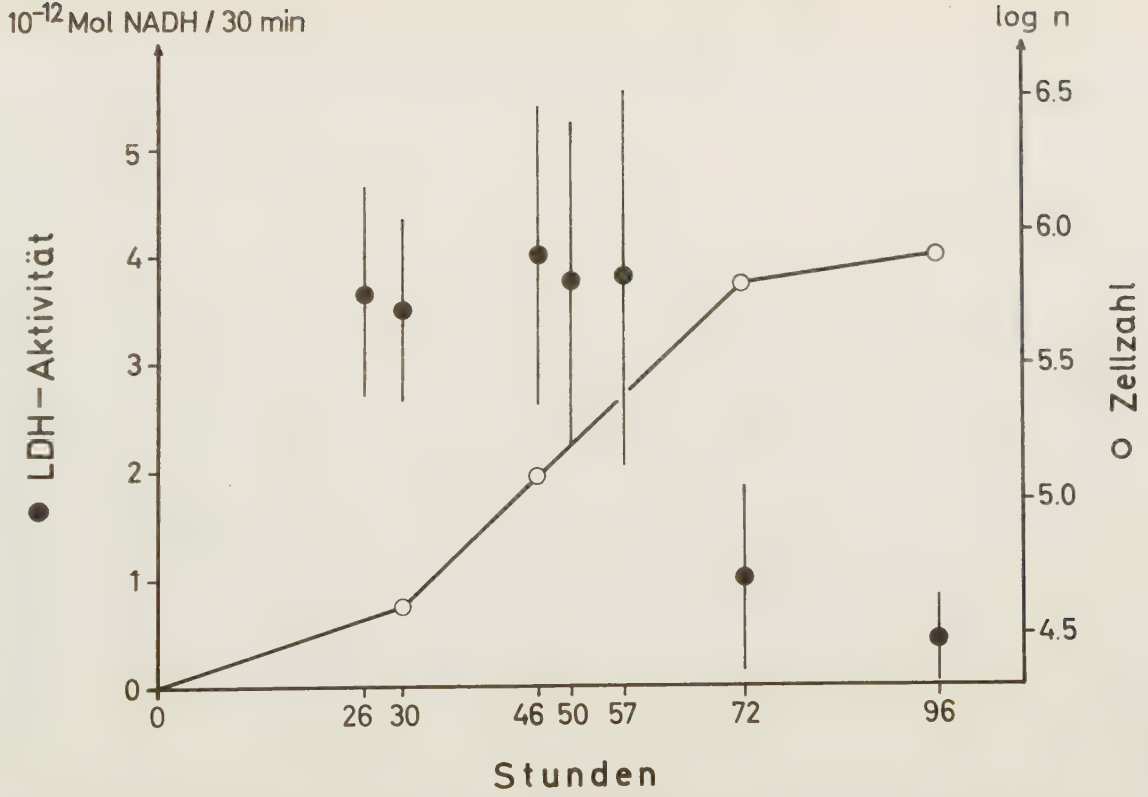

Fig. 5 LDH-Aktivität in Abhängigkeit des Kulturwachstums. Zellinie BCHL Passage 60.

LDH-Aktivität (Mittelwerte aus 12 Messungen pro Kultur)

Zellzahl (Mittelwerte aus drei Messungen vergl.S.5)

Fig. 6 Zellinsel 48 Std. nach Ansatz der Kultur. Zellinie BCHL,Passage 23. Zwei Fibroblasten mit Metaphaseplatte. Färbung nach LEISHMANN, Vergrösserung 220x

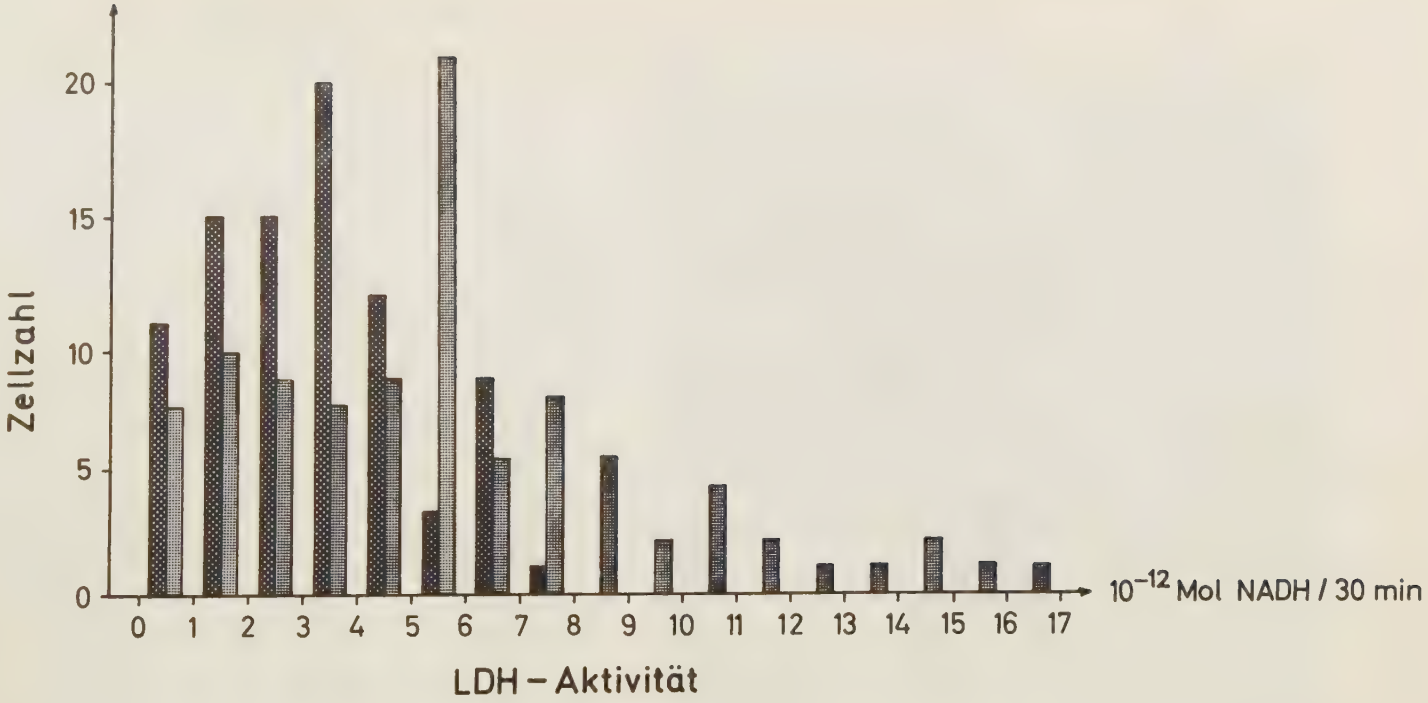

Fig. 7 Häufigkeitsverteilung der LDH-Aktivitäten einzelner Fibroblasten in verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Zellinie BCHL, Passagen 53-60

- Zellen in der Mitosephase. (n=80, Mittelwert $\bar{a}$=3.10 ± 2.6)
- Zellen in nicht definierter Zyklusphase (n=96, Mittelwert $\bar{a}$=5.37)

C U R R I C U L U M V I T A E

Hans Peter Bernhard, Bürger von Maienfeld und Chur (GR) geboren am 17. Mai 1941 in Chur als Sohn des Bernhard Hans, Kaufmann, und der Irma geb. Schmid.
Von 1948 - 1954 besuchte ich die Primarschulen in Chur. 1954 trat ich in das Gymnasium der Bündner Kantonsschule ein und erhielt 1961 das Maturitätszeugnis Typus B. Im Herbst 1962 immatrikulierte ich mich an der philosophischen Fakultät der Universität Basel für das Studium der Zoologie. Die Fächer Botanik, Chemie und Anatomie schloss ich mit Nebenfachexamina ab.

Im Verlauf meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Herren Professoren und Dozenten:
A. Aeschlimann, M. Brenner, H. Erlenmeyer, S. Fallab, E.W. Flückiger, T.A. Freyvogel, R. Geigy, M. Geiger-Huber, C. Grob, F. Grün, A. von Hochstetter, C.G. Honegger, P. Huber, K.S. Ludwig, H. Nüesch, A. Portmann, M. Reichel, T. Reichstein, R. Schenk, H. Seiler, M. Staehelin, W. Stingelin, C. Tamm, G. Wolf-Heidegger und H. Zoller.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung der Herren Professoren Dr. A. Portmann und Dr. Matthys Staehelin in den Jahren 1967 - 1970 am Anatomischen Institut der Universität Basel (Vorsteher Prof. G. Wolf-Heidegger) und an der Abteilung für experimentelle Medizin der Firma Hoffmann-La Roche in Basel. Die Ausführung dieser Arbeit wurde durch ein Stipendium des Kuratoriums der Sandozstiftung zur Förderung der medizinisch und biologischen Wissenschaften unterstützt.